

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 35/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 99114512.7

[43]公开日 2000年5月31日

[11]公开号 CN 1254845A

[22]申请日 1999.10.27 [21]申请号 99114512.7

[74]专利代理机构 江苏省专利事务所

[71]申请人 陆祖宏

代理人 奚胜元

地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

共同申请人 赵雨杰 何农跃

[72]发明人 陆祖宏 赵雨杰 何农跃

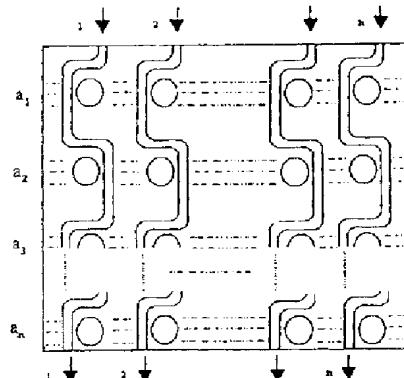
朱纪军 黄 宁 王国著

权利要求书2页 说明书8页 附图页数2页

[54]发明名称 微流体生物芯片检测分析板及其检测方法

[57]摘要

本发明涉及的是一种把微流体生物芯片应用于化学或生物分析体系的微流体生物芯片检测分析板及其检测方法。微流体生物芯片检测分析板其结构由芯片板、盖板构成，芯片板上布有微沟槽通道，通道上联有反应位点，透明盖板密封芯片板，或在芯片板上布有反应位点，在盖板上设置有微沟槽。检测方法将不同种类探针或标记物分子分别固定在微流体生物芯片检测分析板的反应位点上，在同一块芯片上同时对同一试样中的各个组分进行分析。



ISSN 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种微流体生物芯片检测分析板，其特征在于：分析板其结构由芯片板、盖板构成，芯片板上布有微沟槽通道，通道上联有反应位点，透明盖板覆盖密封芯片板，或在芯片板上布有反应位点，在透明盖板上设置有微沟槽，盖板以有微沟槽一面盖在芯片板上，盖板上的微沟槽面将芯片板上的反应位点联起来。

2. 根据权利要求 1 所述的微流体生物芯片检测分析板，其特征在于：(a) 在同一芯片板上制备有一系列微反应位点；(b) 这些微反应位点通过微沟槽通道连结成一封闭的具有微流体流入和流出端口的分析板。

3. 根据权利要求 1 所述的微流体生物芯片检测分析板，其特征在于反应位点可以是微反应池、反应槽或其他形式。

4. 根据权利要求 1 所述的微流体生物芯片检测分析板，其特征在于在芯片板与盖板之间可装夹有固定生物分子的膜片。

5. 一种微流体生物芯片检测分析板检测方法，其特征在于将多种探针物质或标记物分子分别固定在微流体生物芯片检测分析板的反应位点上，每个微反应位点只固定一种，每种探针物质或标记物只与待测物中的某一组分发生杂交、交联或发生特定的化学反应；被检测分析的试样和各种分析试剂按照设定的程序注入流入端口，流经所需的微反应位点，并产生相应的作用；在同一块芯片上同时对同一试样中的各个组分进行定性或定量分析，所得结果可以用光学、电学方法进行检测。

6. 按照权利要求 5 所述的微流体生物芯片检测分析板检测方法，其特征在于可以在分析板上直接固定探针物质或标记物，也可以通过事先将探针物质或标记物固定在微小固相载体上，再放置在分析板上设置位点上构成。

7. 按照权利要求 5，所述微流体生物芯片检测分析板检测方法，其特征在于其反应点上固定的生物物质可以是蛋白质、核酸、PNA、细胞。

8. 按照权利要求 5 所述的微流体生物芯片检测分析板检测方法，其特征在于多种用于检测的探针物质和生物物质可以预先按照设计的阵列和大小，固定在尼龙膜，醋酸纤维纸等纤维膜片上，然后放置在芯片板和盖板之间，使纤维膜片上的探针或生物物质点阵与芯片板或盖板上的反应位点相重合，使之构成一微流体系。

9. 按照权利要求 5，所述微流体生物芯片检测分析板检测方法，其特征在于每一个微反应位点可布有微电极，通过调控电场来控制反应位点上的微反应。

10. 按照权利要求 5，所述微流体生物芯片检测分析板检测方法，其特征在于芯片上微反应位点上发生的特征反应，可用显微镜、光学、电场仪器分析技术来观察并给出结果。

微流体生物芯片检测分析板及其检测方法

本发明微流体生物芯片检测分析板及其检测方法涉及的是一种把微流体生物芯片应用于化学或生物分析与反应体系的检测分析板，尤其是采用微流体通道连接多反应点的新设计。在很短时间内对于同一原料或待测物可以同时分析得到多种成分的所需结果。

生物芯片主要是指通过微细加工技术及超分子自组装技术，在固体芯片表面构建的微分析单元和系统。生物芯片可把许多不同功能器件集成在一起，例如，生物样品的预处理，遗传物质的提取，特定基因片段的扩增，生物探针阵列以及毛细管电泳形成整体的微流体系统，以实现对化合物、蛋白质、核酸、细胞以及其它生物组分的准确、快速、大信息量的筛选或检测。基因芯片是最重要的一类生物芯片，它集成了大量的密集排列的基因探针，能够在短时间内分析大量的基因，使人们可迅速地读取和分析生命的程序。

生物芯片在生物检测、医学检验和疾病诊断、药物筛选和基因序列分析上有着极其重要的意义。例如在生物学中，随着分子生物学的不断发展，特别是举世瞩目的人类基因组计划实施以来，有关核酸、蛋白质序列和结构的数据呈指数增长。而下世纪最富挑战性的工作就是人类基因组计划完成后，即在后基因时代，我们如何运用大量的生物分子信息服务于人类社会，并使医学诊断和治疗产生根本变革。在医学中，“系统、器官、组织、细胞层次上的第二阶段医学”正在向“基因水平上的，DNA→RNA→蛋白质→蛋白质与核酸相互作用，以及它们与环境相互作用水平上的第三阶段医学”转化。这种在分子层次上进行的基因诊断与基因治疗，将根本地认识疾病产生的根源，并将有希望根本认识和治疗包括癌症在内的重大疾病。这些生物学、医学的根本变革，一个根本的前提是基因序列的测

定和分析。能否有效快速地进行基因测序与分析，将影响到人类基因组计划的实施，从而影响生物学、医学的进一步发展。传统基因等生物分子检测所采用的方法包括化学反应、凝胶电泳法等一系列繁杂的步骤，这些方法花费时间较长，且操作繁复，尤其在大规模测序方面费时、并且不适宜便携化快速测序。在对传统基因检测方法进行改进的过程中，以生物芯片为代表的新兴技术应运而生。生物芯片技术是将生命科学研究中所涉及的许多不连续的分析过程，如样品制备，化学反应和分析检测等通过采用微电子，微机械等工艺集成到芯片中，使之连续化，集成化，微型化和自动化。这一技术的成熟和应用将在下世纪的疾病诊断和治疗、新药开发、司法鉴定、食品和环境等生命科学相关领域带来一场革命，为生物信息的获取及分析提供强有力手段。

96 孔板是现行普遍使用的一种用于医学生化检测的常规器具。其上的 96 个反应池彼此隔离互不污染，根据用户需要可任意选用反应池的个数。但所需试剂量仍然较大，也不便于同时连续操作，更不便于同时对试样中多组分的连续快速检测。

本发明的目的是针对目前医学临床常规检验中常规器具存在的不足之处，提出一种微流体生物芯片检测分析板及其检测方法，基于该检测分析板可进行多项指标连续快速分析，且试样和试剂消耗量小，操作简易可行。

微流体生物芯片检测分析板及其检测方法是采取以下方案实现的：

微流体生物芯片检测分析板其结构由芯片板、盖板构成，芯片板上布有微沟槽通道，通道上联有反应位点，透明盖板覆盖密封芯片板，或在芯片板上布有反应位点，在透明盖板上设置有微沟槽，盖板以有微沟槽一面盖在芯片板上，盖板上的微沟槽将芯片板上的反应位点联起来，形成一具有流入和流出端口的封闭

99·11·12

微流体生物芯片检测分析板。

本发明提出的微流体生物芯片检测分析板可对微量试样进行多组分的连续快速分析，检测简单易行，微流体生物芯片检测分析板检测方法如下实现的：

将多种生物或化学的探针分子或标记物分子分别放置和固定在微流体生物芯片检测分析板的微反应位点上，每个微反应位点只固定一种，每种探针分子或标记物分子只与待测物中的某一组分发生杂交、交联或发生特定的化学反应。被检测分析的试样和各种分析试剂按照设定的程序注入流入端口，流经所需的微反应位点，并产生相应的作用。其他物质的吸附将不干扰上述特定反应、杂交或交联。即使有干扰，也可通过洗涤等方法予以排除。微反应位点也可采取下述方法得到：即可以通过事先将探针物质或标记物固定在微小固相载体上，再放入分析板上设置的位点上构成。由于每个微反应位点的探针分子或标记物分子只与待测物中特定的组分发生反应，彼此又互不干扰，就可在同一块芯片上同时对同一试样中的各个组分进行定性或定量分析，所得结果可以用光学、电学方法进行检测。例如可用显微镜、CCD 观察或表面激元共振 (SPR)，表面干涉反射 (RIFS) 等光学、电场技术来观察并给出结果，也可用其它标记的或非标记的方法检测。从而大大提高工作效率，减少试剂用量，真正做到快速、准确、自动化和无污染。探针分子是指可以与指定化学和生物物质产生特异性相互作用的具有专一识别物质功能的物质，可采用生物大分子物质（如蛋白质、核酸、DNA、PNA、细胞等）、化学物和高分子物质探针，标记物可采用生物物质、化学物质。

本发明提出的微流体生物芯片检测分析板，各微反应点上所进行的微反应可以通过电、光、声等物理方法进行加速和调控，例如，可以在各微反应点上分别设置微电极，通过调控电场来控制反应位点上的微反应。通过控制电流的大小

99·11·12

和方向，使特征反应所需反应物快速聚集，不需要的物质快速离开，从而加快反应，提高检测灵敏度和缩短检测时间。

以下将结合附图对本发明作进一步说明。

图 1 为本发明提出的微流体生物芯片检测分析板之一。

图 2 为本发明提出的与图 1 所示微流体生物芯片检测分析板对应的盖板。

图 3 为本发明提出的微流体生物芯片检测分析板之二。

图 4 为本发明提出的与图 3 所示微流体生物芯片检测分析板对应的盖板。

图 5 为本发明提出的微流体生物芯片检测分析板之三。

图 6 为本发明提出的与图 5 微流体生物芯片检测分析板对应的盖板。

图 7 为本发明提出的微流体生物芯片检测分析板之四。

图 8 为本发明提出的与图 7 微流体生物芯片检测分析板对应的盖板。

图 9 为本发明提出的微流体生物芯片检测分析板之五所用的膜片。

图 10 为本发明提出的微流体生物芯片检测分析板之五的芯片分析板。

图 11 为本发明提出的与图 9、图 10 对应的微流体生物芯片检测分析板的盖板。

图 12 为本发明提出的微流体生物芯片检测分析板之六。

图 13 为本发明提出的与图 12 所示微流体生物芯片检测分析板对应的盖板。

参照附图 1 为一种串联型塑料（或金属及其它材料）微流体生物芯片检测分析板（简称微流体板），在该流体板上布有具有流入和流出端口的微沟槽通道，通道上联有反应位点 a、b、c、d……，这些反应位点可以是微反应池、反应槽或其他形式。

参照附图 2 为与图 1 对应的芯片透明盖板（玻璃或塑料），可覆盖密封 A 板，

使之形成封闭的微流体板。

参照附图 3、4 为另一种芯片设计方法，特点是在图 3 所示的芯片板上布有大小均一的微反应位点。a、b、c、d……，这些微反应位点可以是小圆孔，长条形槽等规则形状，也可以是其它形式。

图 4 为与图 3 芯片板对应的透明盖板，在此盖板上设置有微沟槽，当盖板以有微沟槽一面盖在 A 板上时，盖板上的微沟槽正好将芯片板上的反应点联起来。使芯片板上的反应位点通过微沟槽通道连结成一封增长的具有微流体流入和流出端口的分析板。

参照附图 5、6，为另一种芯片分析板设计方式。在图 5 的芯片板上布有多个微沟槽，每个微沟槽串联若干个微反应位点。图 6 为与图 5 相对应的芯片板的盖板。参照附图 7、8，为另一种芯片板设计方式。在图 7 所示芯片分析板上布有若干行彼此独立的反应位点，同一行有若干个彼此独立的反应位点。图 8 为与图 7 芯片分析板对应的盖板。盖上布有若干独立的微沟槽。当盖板以有微沟槽的一面覆盖在图 7 所示的芯片板上时，每个微沟槽正好将一行反应位点串联接起来。

图 9、10、11 为另一种微流体生物芯片检测分析板的设计。图 9 为普通尼龙等可固定生物分子的膜片，用常规的方法在上面固定若干种不同的分子探针和生物物质。图 10 分布有微孔阵列和联有管道的微孔透明盖板，图 11 为一个底板，将膜片夹在透明微孔盖板和底板之间，并使膜片上的生物固定位点与透明微孔盖板上的微孔重合。使整体成为一个微流体板。同样通过光学方面可以对膜片上的特异性反应进行检测。

图 12、13 为另一种微流体生物芯片检测分析板的设计。在图 12 的芯片板上布有若干列并行的微反应点，每列上的微反应点彼此之间互不相连，图 13 为

99·11·12

与图 12 芯片板对应的盖板，在盖板上布有若干行并行的微型通道，1, 2, ……n，每一通道与盖板面之间钻有若干微孔，将微通道与盖板面连接起来。在盖板钻有微孔的这一面另布有与上述微通道垂直走向的若干彼此平行并列的曲型微沟槽，这些微沟槽与微通道及微孔都不相通。先将具有微孔和微沟槽的这一面覆盖在图 12 所示芯片板上时，每一行微孔正好与芯片板上各列微反应点的相同位置上的微反应点对应吻合，例如，盖板上第一行微孔分别与芯片板上各列微反应点的第一个微反应点对应吻合重叠，若将盖板沿着曲形微沟槽的方向移动一定距离，盖板上的微孔不再与芯片板上的微反应点重叠，转而以盖板上的曲形微沟槽将芯片板上的各微反应点连接起来，每一曲形微沟槽联接一列。若再沿着同一方向继续移动一定距离，盖板上的微沟槽及微孔与芯片板上的微反应点将都不重叠。使用时，可以盖板上的微沟槽将芯片板上的各列微反应位点联接起来，由入口 1, 2, ……n 通入反应物，这些反应物可以相同的，也可以是不同的。然后平移盖板以盖板上的微孔，与芯片板上。微反应位点重叠，再由盖板上的微通道 $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$ ，通入第二种反应物，这些反应物可以是相同的，也可以是不同的，依此方法，还可继续引入第三种、第四种……反应物。若需要，每加入一种反应物，可再移动盖板使盖板上的微沟槽或微孔与芯片板上的微反应位点都不重叠，使每个微反应位点彼此完全隔离，在设定的条件下反应一定时间。上述这种设计可避免各微反应位点之间相互交叉污染。反应完毕后，可以盖板上微沟槽将芯片板上各微反应位点联接起来，由入口通入洗涤试剂或蒸馏水进行洗涤。反应的最后结果可用光学或电学的方法进行检测并给出结果。

下面将以实施实例进一步说明本发明提出的微流体生物芯片检测分析板检测方法。

99.11.13

实施实例 1，多种疾病基因的同时检测：如图 1 和图 3，在微流体生物芯片检测分析板上布有均一大小的微反应池 a、b、c、d……，在图 1 中并以微沟槽采取串联方式将各微反应池联结在一起。将已合成好的用于检测乙、丙、丁、戊、庚型肝炎、艾滋……等疾病的 DNA 探针分子固定在图 1（或图 3）所示的芯片板上的微反应池 a、b、c、d……上，每个反应池固定一种探针。或者将用于检测乙、丙、丁、戊、庚型肝炎，艾滋等疾病的 DNA 探针事先分别固定在微小的固相载体上，然后，再将这些固相载体放置在不同的微反应池中。然后以图 2（或图 4）中盖板将芯片板密封盖紧，构成一个串联式检测芯片。然后将整个串联式芯片加热到所需温度，将已经 PCR 扩增并已作好标记（例如荧光标记）的待测物由入口引入，依次流过反应池 a、b、c、d……并在每个微池区停留一定时间，最后从出口流出。然后用缓冲液由入口至出口流动洗涤数次，最后用 CCD 扫描或荧光显微镜观察并给出结果。

实施实例 2:运用酶联免疫吸附测定方法对多种感染性疾病的同时串联检测。

将待测疾病的抗体分别包被在本发明提出的如图 1(或图 3)所示的微流体生物芯片检测分析板 A 上的反应位点 a、b、c、d……上，每个微池包被一种抗体，然后用图 2（或图 4）的盖板密闭覆盖，再加热进行孵育。再由入口通入封闭液进行封闭并通 N_2 气干燥后，由入口通入抗原试剂，37℃孵育一定时间，再通入洗涤缓冲液和去离子水洗涤后，由入口通入干燥氮气进行干燥。最后由入口通入酶联试剂，摇动混匀，37℃孵育一定时间，再由入口通入洗涤缓冲液进行洗涤，然后通入显色剂溶液显色，并于 37℃孵育一定时间，再通入终止液。经洗涤干燥后，用显微镜或 RIFS 或 SPR 或其它方法观察并给出结果。

实施实例 3:人体血型的快速生物芯片化检测，将人体血液抗 A、抗 B 血清

99.11.10

抗蛋白分别化学偶联固定在图 5 (或图 7) 所示芯片板的微反应池 a、b 上, 并用图 6 (或图 8) 所示盖板覆盖闭封, 保温在 37℃。然后将待测标本血液自入口引入。若血液为 A 型, 将在反应位点 a 内发生血凝现象, 若血液为 B 型, 将在反应位点 b 内出现血凝现象。若为 O 型, 在 a、b 反应位点内都不会出现血凝现象; 若为 AB 型, 则在 a、b 反应位点内都将出现血凝现象。血凝现象的出现, 将导致透光度的改变, 也将导致 a、b 微反应池内物质厚度的改变。用光谱分析仪或 RIFS 检测并给出结果。应用该方法可同时对多个血样进行血型分析, 只需将血样 1, 2, 3……分别自入口 1, 2, 3……注入即可。

实施实例 4, 运用膜片型检测分析板对多种感染性疾病的同时检测。

将检测疾病的抗体分别包被在本发明提出的如图 9 所示的尼龙或醋酸纤维纸等纤维膜片上的位点 a、b、c、d……上, 每个位点包被一种抗体, 然后将上述的包被有抗体的膜片上的生物固定位点与透明微孔盖板上的微孔重合, 使整体成为一个微流体板。然后加热进行孵育。再由入口通入封闭液进行封闭并通入 N_2 气干燥后, 由入口通入抗原试剂, 37℃孵育一定时间, 再通入洗涤液冲液和去离子水洗涤后, 由入口通入干燥 N_2 进行干燥, 最后由入口通入酶联试剂, 摆动混匀, 37℃孵育一定时间, 再由入口通入洗涤液冲液进行洗涤。然后, 通入显色剂溶液显色, 并于 37℃孵育一定时间。再通入终止液, 经洗涤干燥后, 用显微镜或 RIFs 或 SPR 或其它方法观察并给出结果。

99.11.12

说 明 书 附 图

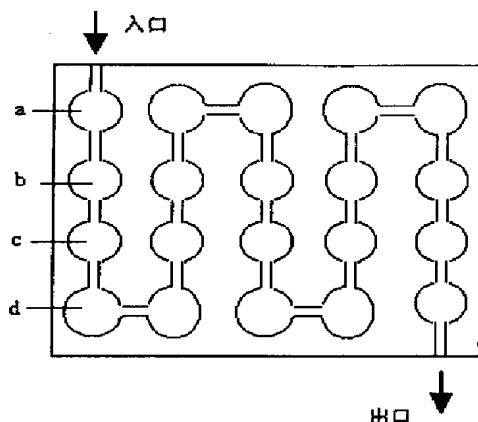


图 1

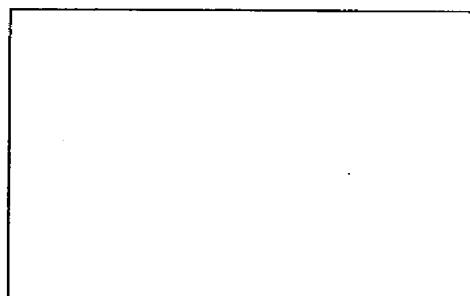


图 2

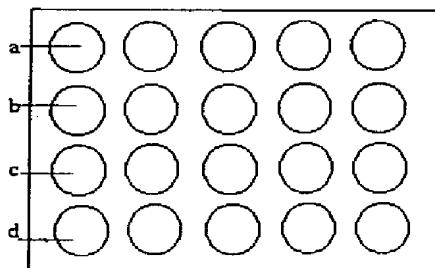


图 3

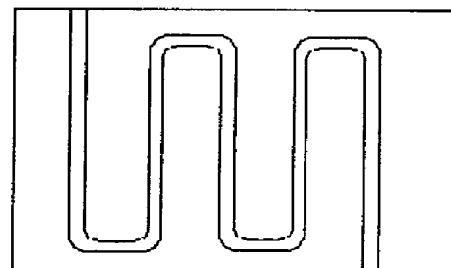


图 4

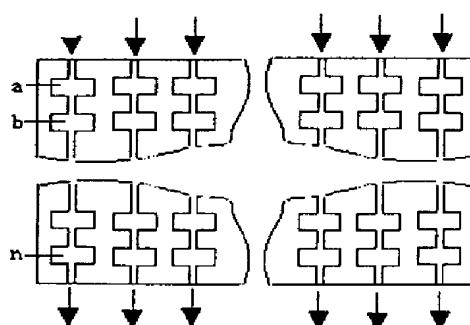


图 5

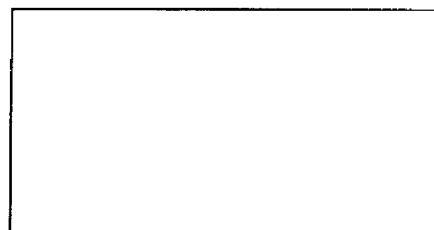


图 6

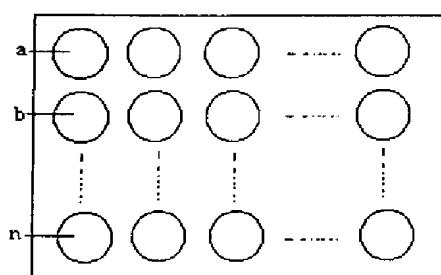


图 7

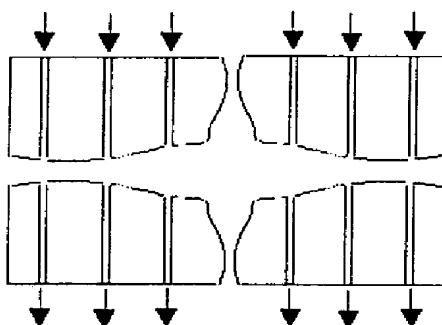


图 8

99.11.12

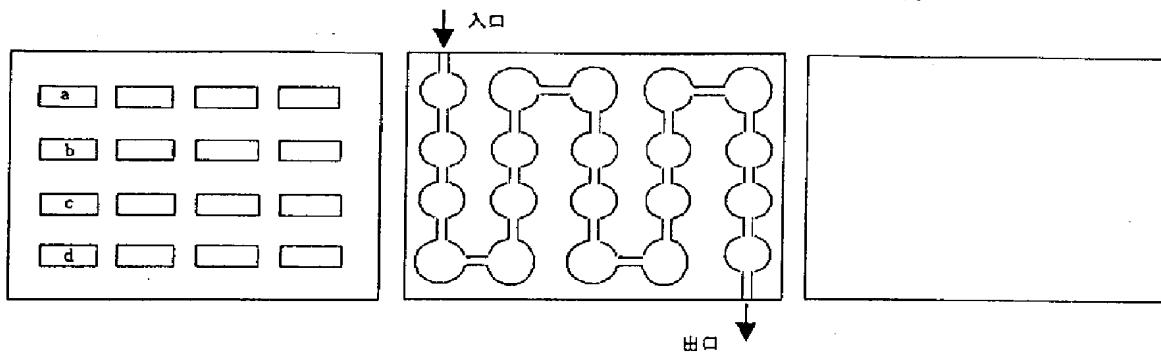


图 9

图 10

图 11

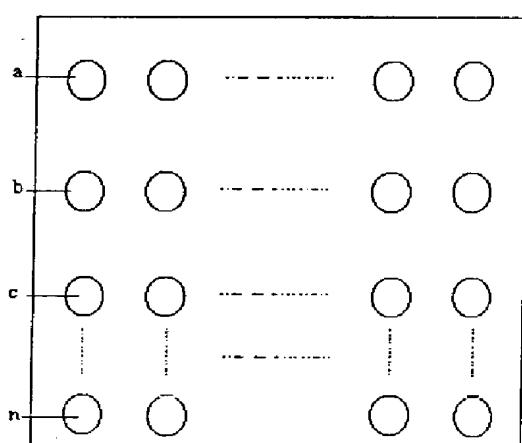


图 12

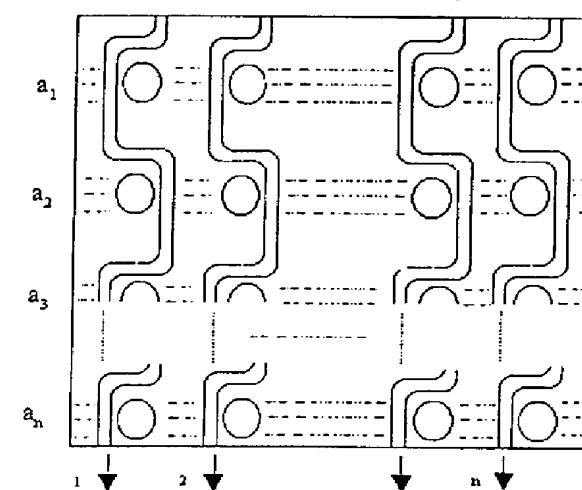


图 13